

【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することに伴う、アグロバクテリウム属細胞を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法。

【請求項2】 植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理した後、遺伝子導入処理を行う請求項1記載の方法。

【請求項3】 熱処理が3℃～80℃の温度範囲で行われる請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 熱処理が35℃～55℃の温度範囲で行われる請求項3記載の方法。

【請求項5】 熱処理が37℃～52℃の温度範囲で行われる請求項4記載の方法。

【請求項6】 熱処理が5秒間～24時間の範囲で行われる請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 37℃～52℃の温度下で1分間～24時間熱処理を行う請求項1又は2記載の方法。

【請求項8】 遠心処理が100G～25万Gの遠心加速度の範囲で行われる請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 遠心処理が500G～20万の遠心加速度の範囲で行われる請求項8記載の方法。

【請求項10】 遠心処理が1000G～15万Gの遠心加速度範囲で行われる請求項9記載の方法。

【請求項11】 遠心処理が1秒間～4時間の範囲で行われる請求項1ないし10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】 用いる植物細胞又は植物組織が被子植物由来である請求項1ないし11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】 用いる植物細胞又は植物組織が单子葉植物由来である請求項12記載の方法。

【請求項14】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ科植物由来である請求項13記載の方法。

【請求項15】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ、トウモロコシ又はシバである請求項14記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】  
【発明の属する技術分野】 本発明は、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 アグロバクテリウムによる形質転換法は、一般的に、効率が低い、導入される遺伝子のコピー数が少ない、T-DNAという特定の領域を断片化させることなく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得ることができるため培養費が安いなど、多くの優れた特徴を持っている。このため、さまざまな植物種でも有用な形質転換の手段として広く用いられている。

【0003】 このように、アグロバクテリウム法は非常に

(19) 日本国特許庁 (J P) (12) 公開特許公報 (A) (11) 特許出願公開番号  
特開2000-342253  
(P2000-342253A)  
(43) 公開日 平成12年12月12日(2000.12.12)

(51) Int. Cl. C 12 N 15/09	識別記号 C 12 N 15/00	F I A 4 B 0 2 4	チーコード(参考) A 4 B 0 2 4
審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 16 項)			
(21) 出願番号 特願平11-158028	(71) 出願人 00004563 日本たばこ産業株式会社 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号		
(22) 出願日 平成11年6月4日(1999.6.4)	(72) 発明者 江井 祐弘 静岡県静岡市駿河区東原700番地 日本たばこ産業株式会社遺伝子育種研究所内		
	(72) 発明者 笠岡 啓介 静岡県静岡市駿河区東原700番地 日本たばこ産業株式会社遺伝子育種研究所内		
	(74) 代理人 100088546 弁理士 谷川 英次郎		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法

(57) 【要約】

【課題】 従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付与することなく簡単に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供すること。

【解決手段】 植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することに伴う、アグロバクテリウム属細胞を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供した。

に優れた植物の形質転換方法であるが、形質転換の成否ならびに効率は、植物種、遺伝子型ならびに用いる植物組織に依存して大きく異なるのが実状である (Berger et al., 1998(参考文献(36))). すなわち、形質転換に成功していない植物種があるほか、ごく一部の品種のみ形質転換が可能な植物種も多い。また、利用可能な組織が限定されており大量の材料を取り扱うことができない植物種もある。遺伝子組換えにより実用的な品種を作出するには、多数の形質転換植物を作出した上で、目的とする形質を持った系統を選抜する必要がある。しかしながら、この目的に即し多数の形質転換体を容易に得ることができない作物の種類は、現状では一部に限られている。したがって、このような問題を解決することができる改良手法の開発が強く望まれている。

【0004】 アグロバクテリウムを介する形質転換方法自体は、植物種により供体材料や培養に用いる培地の組成などを異にするものの、材料となる組織にアグロバクテリウムの懸濁液を接種させ、共存培養の後に形質転換細胞の選抜を行い、形質転換植物を作出するという操作ではほぼ共通している。材料となる植物組織には対しては、通常、必要に応じて滅菌処理を行うがそれ以外に特別な処理を施すことなくアグロバクテリウムの感染が行われる (Rogers et al., 1988(参考文献(37)), Visser 1991(参考文献(41)), McCormick 1991(参考文献(31)), Lindey et al., 1991(参考文献(30))). 従って、形質転換系の改良は、アグロバクテリウムの宿主系、ベクター構成、培地組成、選抜マーカー遺伝子やプロモーターの選別、供体組織の種類などを中心に研究が行われてきた。

【0005】 これに対し、アグロバクテリウムを接種する前の植物組織を、遺伝子導入が生じやすい生理状態に変換するという考え方に基づく研究は、ほとんど行われていない。何らかの簡便な処理により、そのような生理状態に変換することができればいへん利用価値が高くなり、遺伝子導入効率の向上に加え、従来困難であった植物種や遺伝子型の形質転換を可能にする顕著な効果も期待される。これまでの植物組織への前処理に関する研究例としては、パーティクルガン(Park H.N. et al., 1997(参考文献(40)))および超音波(Urick H.N. et al., 1997(参考文献(40)))処理が上げられる。どちらも物理的に組織を付与することによってバクテリアの植物組織内への侵入を促し、感染体となる植物細胞を増加させることを目的としている。しかしながら、これは従来より広く行われているリフティス法(Larsen et al., 1985(参考文献(19)))を改良させたものに過ぎず、新規な考えに基づいた処理ではない。なお、効果の程度や汎用性は明らかでなく、一般的な手法として用いられていないのが現状である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の目的は、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法

よりも高い効率が得られることなく植物に遺伝子導入を行うことができる。植物細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法を提供することである。

(0007)

【課題を解決するための手段】本発明者らは、細菌研究の進展、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入方法において、遺伝子導入に供する植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することにより、遺伝子導入効率を有意に向上させることができることを見出し、本発明を完成した。

(0008) すなわち、本発明は、植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することを行う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法を提供する。

(0009)

【発明の実施の形態】本発明の方法では、アグロバクテリウム属細菌を介した遺伝子導入方法において、遺伝子導入する植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することを行う。植物細胞又は植物組織は、熱処理及び遠心処理した後、常態及び通常の重力下でアグロバクテリウム属細菌と接触させてもよいし、熱処理及び遠心処理した後、アグロバクテリウム属細菌と接触させてもよい。また、アグロバクテリウム属細菌と接触させる前に熱処理及び遠心処理を行う場合、これらの処理は同時に同時に、いずれかの処理を先行した後に、もう一方の処理を行ってもよい。

(0010) 熱処理条件は、用いる植物の種類や熱処理する細胞又は組織の量等に応じて適宜選択されるが、通常、30℃～80℃、好ましくは33℃～55℃、さらに好ましくは37℃～52℃程度の温度範囲で行われる。また、熱処理の時間は、熱処理温度、用いる植物の種類及び熱処理する細胞又は組織の種類等に応じて適宜選択されるが、通常5秒間～24時間程度である。なお、熱処理の時間は、熱処理温度が高い場合には短くても、遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。例えば、熱処理温度が60℃の場合には5秒間程度の熱処理時間でも遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。一方、熱処理温度が34℃程度の低温の場合には、数十分間の熱処理により遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。特に好ましい熱処理条件は、37℃～52℃で1分間～24時間程度の場合が多いが、その植物細胞又は植物組織によっては、熱処理条件は、ルーチンな実験により容易に決定することができる。また、植物細胞又は植物組織を55℃以上の温度で長時間にわたって熱処理すると、植物細胞がダメージを受け、形質転換効率が低下する場合があるため、熱処理温度が55℃以上の場合には、熱処理時間を短くし、例えば3分間以下、好ましくは1分間以下程度に設定して植物細胞がダメージを受けにくいようにすることが好ましい。

(0011) 遠心処理条件は、用いる植物の種類等に応じて適宜選択されるが、通常、100G～250万G、好ましくは500G～200万G、さらに好ましくは1000G～150万G程度の遠心加速度範囲で行われる。また、遠心処理の時間は、遠心加速度及び用いる植物の種類等に応じて適宜選択されるが、通常1秒間以上行うことが好ましい。なお、遠心処理の上限は特にないが、通常、10分間程度を目的とする適宜な範囲である。なお、遠心処理の時間は、遠心加速度が大きい場合には極めて短い時間、例えば1秒以下でも遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。一方、遠心加速度が小さい場合には、遠心処理を長く行うことにより遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。特に好ましい遠心処理条件は、500G～200万G、特に1000G～150000Gで1秒間～2時間程度の場合が多いが、その植物細胞又は植物組織とよっての適切な遠心処理条件は、ルーチンな実験により容易に決定することができる。

(0012) 本発明の方法は、アグロバクテリウム属細菌と接触させる植物細胞又は植物組織として熱処理及び遠心処理したものを、又は熱処理、遠心処理を行わないがアグロバクテリウム属細菌と接触させることを特徴とするものであり、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入あるいは形質転換方法自体としては、周知の方法をそのまま適用することができる。

(0013) アグロバクテリウム属細菌を用いた植物への遺伝子導入あるいは形質転換方法自体は、この分野において周知であり、広く用いられている。

(0014) 土壌細菌アグロバクテリウム (Agrobacterium tumefaciens) が多くの双子葉植物に根癌腫瘍 (crown gall disease) を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、Tiプラスミドが病原性に関与すること、さらにTiプラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後このT-DNAは癌腫の誘発に必要なホモロゲン (サイトカイニンとオーキシン) の合成に関与する遺伝子が存在し、癌腫遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかにされた。T-DNAの切り出しと植物への伝達にはTiプラスミド上のゲリルレンス領域 (vir領域) に存在する遺伝子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT-DNAの両端に存在するターゲター配列が必要である。他のAgrobacterium Tiプラスミドによる同様のシステムを有している (図3及び図4)。

(0015) アグロバクテリウムの感染によってT-DNAが植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNAに所望の遺伝子を導入した遺伝子株は植物ゲノムに組み込まれることが期待された。しかしながら、Tiプラスミドは190kb以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法でT-DNAに遺伝子を導入することは困難

難であった。そのため、T-DNA上に外来遺伝子を導入するたため方法が開発された。

(0016) まず、型植物のTiプラスミドのT-DNAからホモモノ合成遺伝子が除去されたTiプラスミド型の菌株 (disarmed strains) であるLBA4404 (Heckema et al., 1983 (参考文献(14)))、C58C1 (Gallagher) (Zambryski et al., 1983 (参考文献(46))), G371115 (Fralley et al., 1985 (参考文献(10))) などが作成された (図3)。これらを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA中に、あるいは所望の遺伝子を有するT-DNAをアグロバクテリウムに導入する各種の方法が開発された。このうちの一例は、遺伝子操作が容易で所望の遺伝子の導入が可能であり、大腸菌で複製ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA領域中に、三系交雑法 (triparental mating) (Ottita et al., 1980 (参考文献(9))) を介して相互に交換により導入する方法であり、中間ベクター法と呼ばれる (Fralley et al., 1985 (参考文献(10))); Fralley et al., 1983 (参考文献(11)); Zambryski et al., 1983 (参考文献(44)); 特開昭59-140895号 (EP16718) )。もう一つは、バイナリーベクター (binary vector) 法とよばれるもので (図3)、T-DNAの植物への組み込み及びvir領域が必要であるが、機能するために同じプラスミド上に存在しないという結果 (Heckema et al., 1983 (参考文献(14))) に基づいていて、このvir領域にはvirA, virB, virC, virD, virE及びvirGが存在し、(植物バイオテクノロジー事典 (エンタプライズ株式会社発行 (1989)) )、vir領域とはこのvirA, virB, virC, virD, virE及びvirGの全てを含むものをいう。したがって、バイナリーベクターは、T-DNAをアグロバクテリウムと大腸菌の両方で複製可能な小さなプラスミドに組み込んだものであり、これをTiプラスミドに組み込んだものをアグロバクテリウムに導入して用いる。アグロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの方法により行うことができる。バイナリーベクターには、pBIN19 (Bevan, 1984 (参考文献(5))), pBIN21 (Jefferson, 1987 (参考文献(21))), pCAMB2 (An et al., 1988 (参考文献(2)))、特開昭60-70080号 (EP20516) )、1988 (参考文献(2)) などがあり、これらをもとに数多くの新たなバイナリーベクターが構築され、形質転換に用いられている。また、Riプラスミドのシステムにおいて、同様のベクターが構築され形質転換に用いられている。

(0017) アグロバクテリウムA281 (Nelson et al., 1975 (参考文献(42))) は、強病原性 (super-virulent) の菌株であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率は他の菌株より高い (Hood et al., 1987 (参考文献(15))); Kim et al., 1989 (参考文献(23)))。この特性は、A281が有するTiプラスミドのpTiBo542によるものである (Hood et al., 1984 (参考文献(18))); Jin et al., 1987 (参考文献

(22)); Komari et al., 1986 (参考文献(26)))。【0018】pTiBo542を用いて、これまで2つの新しいシステムが開発されている。一つはpTiBo542のTiプラスミド型のTiプラスミドを有する菌株pH101 (Hood et al., 1986 (参考文献(17))) およびpH105 (Hood et al., 1993 (参考文献(16))) を用いたものであり、これらを上記のバイナリーベクターシステムに適用することにより、形質転換能力の高いシステムとして種々の植物の形質転換に利用されている。もう一つは、スーパーバイナリーベクター (super-binary vector) (Niet et al., 1994 (参考文献(23))); Ishida et al., 1996 (参考文献(20)); Komari et al., 1999 (参考文献(28)); W994/0097号、W95/05722号) システムである (図4)。このシステムは、vir領域 (virA, virB, virC, virD, virE及びvirG) (以下、これらをそれぞれ「vir領域」ということもある。) を持つTiプラスミド型 (Tiプラスミド) およびvir領域を有するプラスミドからなることから、バイナリーベクターシステムの一つである。しかしながら、T-DNAを有する側のプラスミド、即ちバイナリーベクターにvir領域のうち、少なくとも一つのvir領域を、実質的に取除いたvir領域の断片 (このうち好ましくはvirB及びvirEを含む断片) を組み込んだ (Komari, 1990a (参考文献(24))) スーパーバイナリーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーバイナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだT-DNA領域を導入するには、三系交雑法を介した相互感染 (参考文献(27))、このスーパーバイナリーベクターシステムは、上述の種々のベクターシステムと比べて、多くの植物種で非常に高い形質転換効率をもたらすことが明らかとなっている (Niet et al., 1994 (参考文献(23))); Ishida et al., 1996 (参考文献(20)); Komari, 1990b (参考文献(25)); Li et al., 1996 (参考文献(29)); Saito et al., 1992 (参考文献(38)))。

【0019】本発明の方法においては、宿主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、Agrobacterium tumefaciens (例えば上述のAgrobacterium tumefaciens LBA4404 (Heckema et al., 1983 (参考文献(14))) およびpH101 (Hood et al., 1986 (参考文献(17))) を好ましく用いることができる。

【0020】本発明の方法によれば、アグロバクテリウム属細菌における病原性 (vir) 領域の遺伝子群の発現に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されることなく有害な効果を得ることができる。したがって、上述の中間ベクター、バイナリーベクター、強病原性のバイナリーベクター、スーパーバイナリーベクターなどいずれのベクターシステムに対しても用いることができ、本発明による効果を得ることができる。これらのベクター類を改変した異なるベクターシステムを用いる場合におい



境に左右されやすく形質転換に好適な未熟胚材料を常時得ることは容易ではないが、組み合わせた処理を施すことにより安定した高い形質転換効率を維持することが可能である。Hiei et al. (1994(参考文献(13)))は、形質転換能力の高いベクターであるスーパーバイナリーベクターがイネの形質転換効率を向上させることを示した。また、Albenita et al., 1996(参考文献(1))によれば、スーパーバイナリーベクターのLB4404(pQJ21)を用いた試験においては、形質転換率を維持している。本研究における組み合わせた処理法は、通常のバイナリーベクターを用いた場合においても、スーパーバイナリーベクター

\* ターに匹敵するか、それ以上の遺伝子導入効率を得ることができる。また、スーパーバイナリーベクターと組み合わせた処理法を併用することにより、より一層効率を向上させることが可能である。さらに、組み合わせた処理法を用いることにより、これまで全く形質転換体を得ることができなかった品種においても形質転換体を得ることができると推察される。

【0042】

【表1】表1 熱・遠心処理と未熟胚値におけるQ5遺伝子の一過性発現 (品種：朝の光)

処理温度 (処理時間)	遠心速度 (処理時間)	検数	未熟胚値 胚発芽面における Q5 発現陽性の割合 (%)						
			0	0-1	1-10	10-20	20-50	50-80	80-100
-	-	20	3	6	1	0	0	0	0
46°C (5分)	-	20	1	6	7	4	2	0	0
-	20,000 (30分)	20	0	1	4	7	7	1	0
46°C (5分)	20,000 (30分)	20	0	0	0	2	9	8	1

供試菌株系：LB4404(pQJ21)株、共存培養期間：5日 ※ 【表2】表2 熱・遠心処理と未熟胚値におけるQ5遺伝子の一過性発現 (品種：朝の光)

処理温度 (処理時間)	遠心速度 (処理時間)	検数	未熟胚値 胚発芽面における Q5 発現陽性の割合 (%)						
			0	0-1	1-10	10-20	20-50	50-80	80-100
-	-	20	3	13	4	0	0	0	0
46°C (5分)	-	20	0	0	10	7	3	0	0
-	20,000 (30分)	20	0	0	3	9	8	0	0
46°C (5分)	20,000 (30分)	20	0	0	0	3	14	3	0

供試菌株系：LB4404(pQJ21)株、共存培養期間：6日 ※ 【表3】表3 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率 (品種：朝の光)

処理温度 (処理時間)	遠心速度 (処理時間)	供試菌株 胚切片数	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度 (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度 (%)	B/A (%)
-	-	50	6	12.0	-
46°C (5分)	-	51	15	29.4	-
-	20,000 (30分)	51	29	56.9	-
46°C (5分)	20,000 (30分)	48	29	83.0	-

供試菌株系：LB4404(pQJ21)株、共存培養期間：5日、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ※ 【表4】表4 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率 (品種：朝の光)

処理温度 (処理時間)	遠心速度 (処理時間)	胚切片数	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度 (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度 (%)	B/A (%)
-	-	60	7	11.7	-
46°C (5分)	-	60	9	15.0	-
-	20,000 (1分)	60	48	80.0	-
-	20,000 (30分)	60	48	80.0	-
46°C (5分)	20,000 (1分)	60	51	83.0	-
46°C (5分)	20,000 (30分)	60	51	85.0	-

供試菌株系：LB4404(pQJ21)株、共存培養期間：6日、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ※ 【表5】表5 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率 (品種：朝の光)

処理温度 (処理時間)	遠心速度 (処理時間)	胚切片数	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度 (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度 (%)	B/A (%)
-	-	62	18	28.0	-
46°C (5分)	-	64	32	82.5	-
-	20,000 (30分)	80	39	66.0	-
46°C (5分)	20,000 (30分)	80	41	68.3	-

供試菌株系：LB4404(pQJ21)株、共存培養期間：6日、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ※ 【表6】表6 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率 (品種：朝の光)

処理温度 (処理時間)	遠心速度 (処理時間)	胚切片数	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度 (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度 (%)	B/A (%)
-	-	62	18	28.0	-
46°C (5分)	-	64	32	82.5	-
-	20,000 (30分)	80	39	66.0	-
46°C (5分)	20,000 (30分)	80	41	68.3	-

供試菌株系：LB4404(pQJ21)株、共存培養期間：6日、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ※ 【表7】表7 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率 (品種：朝の光)

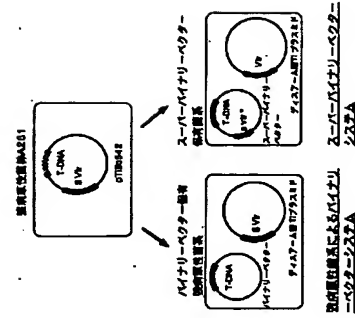
処理温度 (処理時間)	遠心速度 (処理時間)	胚切片数	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度 (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度 (%)	B/A (%)
-	-	62	18	28.0	-
46°C (5分)	-	64	32	82.5	-
-	20,000 (30分)	80	39	66.0	-
46°C (5分)	20,000 (30分)	80	41	68.3	-



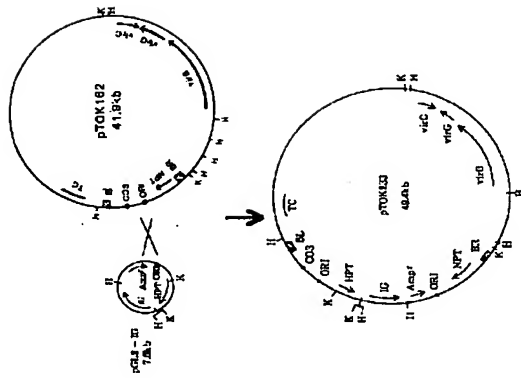
- (1987) Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strains in A281 on leucines. *Plant Physiol.* 81, 529-534.
- (16) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hekmat, A. (1993) Novel *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2, 208-218.
- (17) Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, R.T. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168, 1291-1301.
- (18) Hood, E.E., Jon, G., Kayes, L., Kramer, J., Fraley, R.T. and Chilton, M.D. (1984) Restriction endonuclease map of pTiBo542, a potential Ti-plasmid vector for genetic engineering of plants. *Bio/Technology*, 2, 702-709.
- (19) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hofmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.
- (20) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (Zea mays L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*, 14, 745-750.
- (21) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology*, 5, 387-405.
- (22) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Mester, E.W. (1987) Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. *J. Bacteriol.* 169, 4417-4425.
- (23) Komari, T. (1989) Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by *Agrobacterium*. *Plant Sci.* 60, 223-229.
- (24) Komari, T. (1990a) Genetic characterization of double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment. *Theor. Appl. Genet.* 80, 107-117.
- (25) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Reports*, 9, 303-306.
- (26) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Hiei, Y. (1996) Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTiBo542. *J. Bacteriol.* 176, 88-94.
- (27) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Hiei, Y. (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Pl*
- diated by *Agrobacterium tumefaciens* and sequestration of transformants free from selection markers. *Pl*
- ant J. 10, 165-174.
- (28) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Genetic Transformation: *Agrobacterium tumefaciens*. In Vasil, I.K. (ed.) *Molecular improvement of cereal crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 43-82.
- (29) Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, I. and Poon, C.-K. (1996) Genetic transformation of *Carotum* (L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 14, 736-740.
- (30) Lindsey, K., Gallois, P. and Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugarbeet by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual* 86:1-9. Kluwer Academic Publishers.
- (31) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual* 86:1-9. Kluwer Academic Publishers.
- (32) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant* 15:473-497.
- (33) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Nakanuma, K. (1990) Construction and expression in tobacco of a  $\alpha$ -glucuronidase (GUS) reporter gene containing a n intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiology* 31: 805-813.
- (34) Potrykus, I., Herms, C. T. and Lutz, H. (1979) Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 54:209-214.
- (35) Potrykus, I., Billaud, R., Futterer, J., Sautter, C. and Schrott, M. (1998) *Agricultural Biotechnology*, Marcel Dekker Inc. pp. 119-159.
- (36) Rogers, S.G., Horsch, R.B. and Fraley, R. T. (1988) Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors. *Method for Plant Molecular Biology*, Oxford Academic Press Inc. pp.423-436.
- (37) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takanami, Y. (1992) Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.* 83, 679-683.
- (38) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) *Plant Sci.* 41:179-183
- (39) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1997) *SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation*. *Transgenic Research* 6:329-336.
- (40) Visser, R.G.F. (1991) *Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens**. *Pl*

- ant Tissue Culture Manual 85:1-9. Kluwer Academic Publishers.
- (42) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.D. and Mester, E.W. (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 123, 255-264.
- (43) Xiao, L., He, S.-B. (1997) Efficient selection and regeneration of *Agrobacterium tumefaciens* strains following particle bombardment. *Plant Cell Reports* 16:874-878.
- (44) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (45) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Stoklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turfgrass (*Apoetis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. *Plant Cell Reports* 13:1-6.
- (46) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (47) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Stoklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turfgrass (*Apoetis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. *Plant Cell Reports* 13:1-6.
- (48) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (49) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Stoklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turfgrass (*Apoetis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. *Plant Cell Reports* 13:1-6.
- (50) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (51) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (52) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (53) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (54) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (55) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (56) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (57) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (58) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (59) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (60) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (61) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (62) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (63) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (64) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (65) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (66) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (67) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (68) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (69) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (70) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (71) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (72) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (73) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (74) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (75) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (76) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (77) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (78) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (79) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (80) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (81) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (82) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (83) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (84) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (85) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (86) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (87) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (88) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (89) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (90) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (91) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (92) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (93) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (94) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (95) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (96) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (97) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (98) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (99) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.
- (100) Zambryski, P., Joo, H., Genetello, C., Leenaars, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.

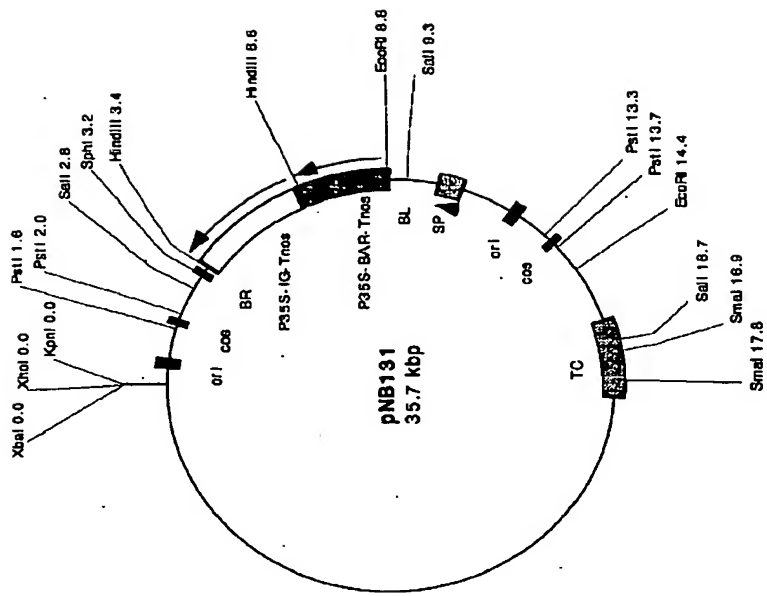
[図4]



【21】



【图2】



## フロントページの続き

(72) 发明者 石田 祐二

静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社遺伝育種研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA08 DA01 EA04 CA11 HA20

【图3】

